

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：33303  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K15016  
研究課題名（和文）培養HL-1心房筋細胞の実験系を用いた後脱分極誘発不整脈の発生機序と抑制法の解明  
  
研究課題名（英文）Mechanism and suppression of afterdepolarization-induced arrhythmias in HL-1 cells  
  
研究代表者  
九田 裕一（KUDA, Yuhichi）  
  
金沢医科大学・医学部・講師  
  
研究者番号：50566916  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：心房細動は最も多い不整脈であり、様々な病態下で心房筋細胞に発現する後脱分極がそのトリガーであると考えられている。本研究の目的は、後脱分極誘発が可能なHL-1心房筋細胞の実験系を確立し、後脱分極発現の機序と抑制法を検証することであった。パッチクランプ法及び蛍光測光装置を用いた膜電位・細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度測定によって、興奮生成・伝播過程と細胞内Ca<sup>2+</sup>トランジェントを記録し、様々なイオンチャネル・トランスポーター修飾薬の投与により後脱分極が惹起されることを証明して、後脱分極抑制効果の解析が可能でヒトiPS細胞由来心房筋細胞を用いた不整脈発生機序の解析にも応用できるHL-1心房筋細胞の実験系を確立した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

後脱分極発生機序の動物心筋を用いた電気生理学的解析は以前から行われているが、全て実験条件の異なる個別的研究であり、後脱分極発生機序の統合的理解は未だなされていない。近年、iPS細胞由来心房筋細胞を用いた研究が盛んになっているが、継代培養できない細胞での体系的な研究は困難であり、後脱分極発現機構の本質的理解やその合理的抑制方法の解明には新たな実験系が必要である。本研究により培養HL-1心房筋細胞を用いた継続的かつ体系的な電気生理学的研究が可能な実験系が確立され、後脱分極の発生機序と抑制方法の統合的検証が可能となった。本研究の成果は、不整脈の予防・治療法の開発に繋がるものであり、臨床的にも重要である。

研究成果の概要（英文）：Atrial fibrillation is the most common arrhythmia and is thought to be induced by afterdepolarizations that occur in cardiomyocytes under a variety of pathological conditions. The aim of this study was to establish an experimental system for cardiomyocytes in which afterdepolarizations could be induced and thereby determine the mechanism and suppression strategy for afterdepolarizations. Using the whole-cell patch clamp method and fluorescence photometry, we have established an experimental system for HL-1 mouse atrial myocytes in which generation and propagation of action potentials and intracellular Ca<sup>2+</sup> transients were recorded. Early and delayed afterdepolarizations could be induced by various modulators of ion channels and transporters in this system. This experimental system is useful in analyzing mechanisms for afterdepolarization-induced arrhythmias systematically and is expected to be applied to future studies using human iPS cell-derived cardiomyocytes.

研究分野：心臓生理学

キーワード：HL-1マウス心筋細胞 早期後脱分極（EAD） 遅延後脱分極（DAD） パッチクランプ Ca<sup>2+</sup>測光 膜電位

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心房細動は最も多い不整脈であり、イオンチャネル遺伝子の異常や虚血・心不全など様々な病態下で心房筋細胞に発現する後脱分極 早期後脱分極 (EAD) ならびに遅延後脱分極 (DAD) が撃発活動を惹起し、心房細動がトリガーされると考えられている (Nattel et al, Eur Heart J, 2012, 2014) が、心房細動発生機序の詳細は未だ不明である。また、QT 延長症候群は心電図 QT 間隔の延長を特徴とし、致死的な多形性心室頻拍を生じて突然死を起こす症候群である。イオンチャネル遺伝子の異常による遅延整流  $K^+$  チャネル電流 ( $I_K$ ) の減弱や  $Na^+$  チャネル電流 ( $I_{Na}$ ) 非不活性化成分の出現に伴って心室筋細胞に生じる EAD が心室頻拍のトリガーになると考えられている (Weiss et al, Heart Rhythm, 2010)。したがって、後脱分極発生機序の解明とその合理的制御法の確立が、心房細動や心臓突然死の発生を予防する上で必要不可欠である。単離動物心筋を用いた後脱分極発生機序の電気生理学的解析は数多く行われており、 $I_K$  電流や内向き整流  $K^+$  チャネル電流 ( $I_{K1}$ ) の抑制、L 型  $Ca^{2+}$  チャネル電流 ( $I_{CaL}$ ) の増強 (再活性化)、筋小胞体の自発性  $Ca^{2+}$  遊離など様々なメカニズムが提唱されている (Antzelevitch, Card Electrophysiol Clin, 2011; Zhao et al, Am J Physiol, 2012) が、これまでの研究は全て個別のかつ多様な条件下で行われており、後脱分極発生機序の統合的理解は未だなされていない。その大きな理由は、後脱分極発生機序の全容解明に必要な長期間の体系的な研究に適した実験系が確立されていないことである。継代培養できない単離心筋細胞や幹細胞由来心筋細胞は長期間の継続的な電気生理学的解析には不適であり、継代培養可能な心筋細胞を用いて後脱分極の発現機構・合理的抑制法の解明に適した新たな実験系を確立する必要がある。マウス心筋筋由来の HL-1 細胞は継代培養可能な唯一の哺乳類心筋細胞であり、成マウス心筋細胞に極めて近い電気生理学的特性を保持している。HL-1 細胞を用いれば安定した継続的な実験が可能となり、後脱分極を始めとする異常自動能・不整脈研究のための再現性に優れた実験系を確立できると考え、本研究を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、後脱分極誘発が可能な培養 HL-1 マウス心筋筋細胞の電気生理学的実験系を確立し、疾患モデル心筋細胞における後脱分極発現の機序 (形質膜及び筋小胞体の各種イオンチャネル・トランスポーターの関与) と合理的抑制法を解明することである。HL-1 心筋細胞の電気生理学的実験系を構築してパッチクランプ法ならびに蛍光測光法による興奮生成・伝播と細胞内  $Ca^{2+}$  動態の解析が可能であることを証明し、将来行うべきヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心房細動や心室頻拍の発生機序・制御法の解析に応用可能な基礎実験系を確立することを第 1 目的とした。また、HL-1 細胞の実験系を用い、各種病態 (イオンチャネル・トランスポーターの機能異常) における EAD・DAD の発生機序を統合的・体系的に検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) HL-1 心筋細胞実験系の確立

HL-1 細胞を専用の培養液 (Claycomb 培地) 中で培養し、パッチクランプ用機器 (Axopatch 200B, pClamp10) を用いて、ホールセル・パッチクランプ法により HL-1 細胞の活動電位と形質膜イオンチャネル電流 (内向き整流  $K^+$  チャネル電流  $I_{K1}$ , 過分極活性化陽イオンチャネル電流  $I_f$ ) の動態を解析した。また、蛍光測光装置 (ARGUS, 浜松ホトニクス) を用いて、FluoVolt による膜電位測定と Cal-520 による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定を行い、自発性活動電位とその伝播過程、細胞内  $Ca^{2+}$  トランジェントを観察・記録した。これらの実験系において、活動電位持続時間を延長させる  $I_K$  の速い活性化成分 ( $I_{Kr}$ ) 阻害薬 (E-4031) および L 型  $Ca^{2+}$  チャネル電流を増強させるイソプロテレノール、細胞内  $Ca^{2+}$  過負荷を来す高濃度ジギタリス (Digoxin) を投与し、早期ならびに遅延後脱分極を誘発できるか否かを検証した。

#### (2) 後脱分極 (EAD・DAD) の発現条件と発生機序の解明

ホールセル・パッチクランプ法ならびに蛍光測光装置を用いた膜電位・細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定を行い、まず各種濃度の  $I_{Kr}$  阻害薬 (E4031) およびイソプロテレノール負荷により早期後脱分極 (EAD)、ジギタリス (Digoxin) 投与により遅延後脱分極 (DAD) が発生するか否かを検証した。また、EAD あるいは DAD の発生が認められた場合に細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の自発的上昇・振動が発生するか否か、筋小胞体  $Ca^{2+}$  遊離チャネル阻害薬 (ryanodine) および  $Ca^{2+}$  ポンプ阻害薬 (thapsigargin) 投与で活動電位持続時間短縮あるいは後脱分極の抑制が生じるか否かを検証した。さらに、 $I_{Kr}$  活性化薬 (NS3623; ICA-105574)、 $I_{Ks}$  活性化薬 (ML277; TAN)、 $I_{K1}$  活性化薬 (zacopride)、 $Na^+/Ca^{2+}$  交換体抑制薬 (KB-R7943) による活動電位・膜電流・細胞内  $Ca^{2+}$  動態の変化を解析し、各イオンチャネル・トランスポーター修飾薬の後脱分極抑制効果を比較検証している。

### 4. 研究成果

#### (1) HL-1 心筋細胞実験系の確立

まず、HL-1 細胞の電気生理学的特性を明らかにするために、ホールセル・パッチクランプ法により HL-1 細胞の活動電位と形質膜イオンチャネル電流 ( $I_{K1}$ ,  $I_f$ ) の動態を解析した。HL-1 細胞には自発性活動電位を示す細胞と示さない細胞が混在していること、 $I_{K1}$  電流の密度は細胞ごとに異なっており、 $I_{K1}$  の少ない細胞が自動能を示す傾向があること、 $I_f$  電流は存在する細胞としない細胞があるが自動能の有無とは無関係であることが確認された。さらに、カフェイン投与により自動能が消失することを見出した。特異的  $I_f$  ブロッカー (ivabradine) 投与では自発性活動電位の頻度の減少が見られたが、自動能は停止しなかった。バリウムによる  $I_{K1}$  のブロックで非ペースメーカー細胞に自動能が発生したことから、 $I_{K1}$  が自動能を制御する重要な因子の一つであると考え、Kir2.1( $I_{K1}$ ) チャネルをウイルスベクターを用いたトランスフェクションにより過剰発現させることで膜電位を安定化させ自動能を消去することができた。また、パッチクランプ法での確認と並行して膜電位と細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の蛍光測光でも自動能の有無の確認を行い、カフェイン投与により自動能と  $Ca^{2+}$  トランジェントが消去されることを確認した。しかしながら、筋小胞体  $Ca^{2+}$  遊離チャネル阻害薬 (ryanodine)、筋小胞体  $Ca^{2+}$  ポンプ阻害薬 (thapsigargin) では自動能は消去できなかった。

次に、HL-1 細胞の実験系で後脱分極の誘発が可能であることを証明するために、特異的  $I_{Kr}$  阻害薬 (E-4031) およびイソプロテレノール、高濃度ジギタリス (Digoxin) を投与し、活動電位の変化をパッチクランプ法および蛍光膜電位測定法により検証した。 $I_{Kr}$  阻害薬 E-4031 (5  $\mu$ M) とイソプロテレノール (10  $\mu$ M) の併用で活動電位持続時間の著明な延長と活動電位第 2 相 (プラトー相) での EAD 様膜電位振動 (一過性脱分極) を誘発できること、高濃度ジギタリス (150 nM) の長時間 (~90 分) 投与で DAD とそれに伴う撃発活動 (triggered activity) を誘発できることを確認し、後脱分極を再現できる HL-1 細胞の実験系を確立することができた。

## (2) 後脱分極の発現条件と発生機序の解明

HL-1 細胞における後脱分極の発現条件を明確にするために、特異的  $I_{Kr}$  阻害薬 E4031 (0.3~5  $\mu$ M) およびイソプロテレノール (1~10  $\mu$ M) あるいはジギタリス (Digoxin ~150 nM) の各種投与条件・濃度での効果を検証した。E-4031 の単独投与により  $I_{Kr}$  を抑制すると HL-1 細胞の活動電位持続時間は著明に延長したが、EAD 様の膜電位振動は観察されなかった。イソプロテレノールの併用投与による L 型  $Ca^{2+}$  チャネル電流増強で phase-2 EAD 様の一過性脱分極が一部の細胞に誘発された (図 1 参照)。EAD 様膜電位振動が誘発された条件下で細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定を行ったが、 $Ca^{2+}$  濃度の振動性変化 (一過性の上昇) は認められず、HL-1 細胞における EAD の成因は、形質膜 L 型  $Ca^{2+}$  チャネル電流の再活性化 (膜クロック) であり、筋小胞体の自発性  $Ca^{2+}$  遊離とそれに伴う内向き  $Na^+$ / $Ca^{2+}$  交換電流の活性化 ( $Ca^{2+}$  クロック) ではないと推察された。また、ジギタリス投与による  $Na^+$ - $K^+$  ポンプ抑制で一部の細胞に DAD および撃発活動が誘発された (図 2 参照) が、DAD 誘発には高濃度ジギタリス (Digoxin 150 nM) の長時間 (~90 分) 投与が必要であった。現在、EAD 発生時に細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の一過性上昇が認められるか否かをさらに追試し、筋小胞体  $Ca^{2+}$  遊離チャネル阻害薬 (ryanodine) および  $Ca^{2+}$  ポンプ阻害薬 (thapsigargin) 投与で活動電位持続時間の短縮あるいは後脱分極の抑制が生じるか否かを検討している。さらに、 $I_{Kr}$  活性化薬 (NS3623; ICA-105574)、 $I_{Ks}$  活性化薬 (ML277; TAN)、 $I_{K1}$  活性化薬 (zacopride)、 $Na^+$ / $Ca^{2+}$  交換体抑制薬 (KB-R7943) の後脱分極抑制効果についても活動電位・膜電流・細胞内  $Ca^{2+}$  動態の測定により解析を進めている。

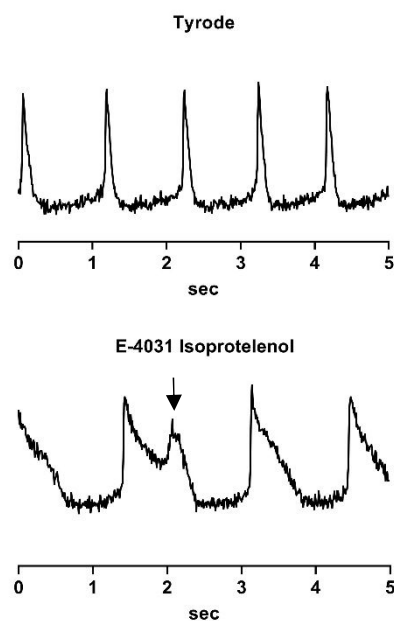


図 1 E-4031 (5  $\mu$ M) とイソプロテレノール (10  $\mu$ M) の併用投与による phase-2 EAD 様の電位振動 (矢印) の誘発

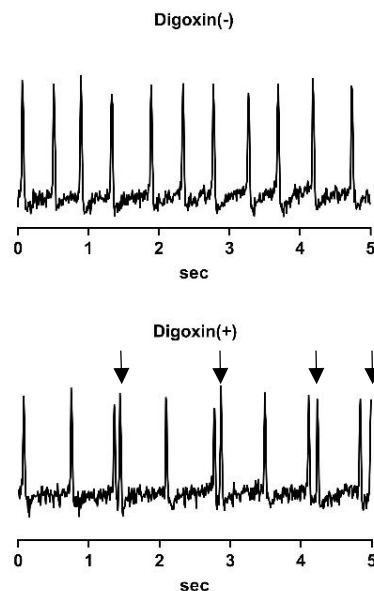


図 2 ジギタリス (Digoxin 150nM) による遅延後脱分極・撃発活動 (矢印) の誘発

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurata Yasutaka, Tsumoto Kunichika, Hayashi Kenshi, Hisatome Ichiro, Kuda Yuhichi, Tanida Mamoru	4. 巻 10
2. 論文標題 Multiple Dynamical Mechanisms of Phase-2 Early Afterdepolarizations in a Human Ventricular Myocyte Model: Involvement of Spontaneous SR Ca <sup>2+</sup> Release	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2019.01545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 九田裕一、倉田康孝、池田崇之、谷田守、津元国親、芝本利重、米倉秀人
2. 発表標題 HL-1マウス心房筋細胞におけるIK1電流の動態・特性の解析と発現制御
3. 学会等名 第98回 日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 九田裕一、倉田康孝、池田崇之、谷田守、津元国親、芝本利重、米倉秀人
2. 発表標題 HL-1マウス心筋細胞を用いた自動能機序の解明
3. 学会等名 第67回 中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 九田裕一、倉田康孝、池田崇之、谷田守、津元国親、芝本利重、米倉秀人
2. 発表標題 HL-1マウス心筋細胞を用いた自動能機序の解明
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------